

# 介导两种半纤维素酶分泌表达的信号肽比较

杨青<sup>1</sup> 汪斌<sup>1</sup> 王亚伟<sup>1</sup> 张华山<sup>2</sup> 熊海容<sup>1</sup> 张莉<sup>1\*</sup>

(1 中南民族大学生命科学院 武汉 430074 2 湖北工业大学发酵工程省部共建教育部重点实验室 武汉 430068)

**摘要** 木聚糖酶和甘露聚糖酶是两种主要的半纤维素酶, 广泛应用于诸多领域。本研究选择了3种毕赤酵母内源信号肽 Scw11、Dse4 和 Exg1, 以 $\alpha$ -factor 为参照, 分别在毕赤酵母 X33 中用于表达实验室前期获得的耐热木聚糖酶 DSB 和耐热甘露聚糖酶 ManA, 选择适合 DSB 和 ManA 表达的信号肽以提高胞外酶活水平。结果表明不同信号肽引导的两种半纤维素酶的酶活水平相差较大: 对 DSB (分子量为 23 KDa),  $\alpha$ -factor 介导的表达效率明显优于其它3种信号肽; 但对 ManA (分子量为 30 KDa), Dse4 和 $\alpha$ -factor 介导的表达效率相当且明显优于 Scw11 和 Exg1。因此在 X33 中表达 DSB 时应选用 $\alpha$ -factor, 而表达 ManA 时应选用 Dse4 或 $\alpha$ -factor。此外胞内酶活的结果显示 $\alpha$ -factor 介导的 DSB 和 ManA 重组菌胞内滞留酶活明显高于其它信号肽, 而分子量为 30 KDa 的 ManA 的滞留酶活又明显高于分子量为 23 KDa 的 DSB, 因此在表达 ManA 蛋白时, 选用其它的信号肽, 如 Dse4, 会减少外源蛋白在胞内的滞留从而在一定程度上提高外源蛋白的分泌量。本研究为毕赤酵母表达系统鉴定更多可用的信号肽并筛选到针对目的蛋白的最优信号肽奠定了一定的基础。

**关键词** 信号肽 巴斯德毕赤酵母 木聚糖酶 (DSB) 甘露聚糖酶 (ManA)

## Comparison of Signal Peptides for Two Hemicellulase Secretory Expression

YANG Qing<sup>1</sup> WANG Bin<sup>1</sup> WANG Ya-wei<sup>1</sup> ZHANG Hua-shan<sup>2</sup> XIONG Hai-rong<sup>1</sup>  
ZHANG Li<sup>1\*</sup>

(1 College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; 2 Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

**Abstract** Xylanase and mannanase are two hemicellulases, which are widely used in many fields. To improve the expression of thermostable xylanase DSB and thermostable mannanase ManA in *Pichia pastoris*, three endogenous signal peptides of *Pichia pastoris* (Scw11, Dse4 and Exg1) were chosen. We compared their capability to mediate the secretion of DSB and ManA with that of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -factor. In shake-flask cultivation, three endogenous signal peptides and  $\alpha$ -factor efficiently mediated the secretion of DSB and ManA, but the secretion efficiency has obvious difference. As for DSB, the expression efficiency of  $\alpha$ -factor was much higher than three endogenous signal peptides. But as for ManA, the expression efficiency of Dse4 was equal to  $\alpha$ -factor and much higher than Scw11 and Exg1. Therefore,  $\alpha$ -factor is the most efficient signal peptide for DSB expression and Dse4 or  $\alpha$ -factor are the most efficient signal peptide for ManA expression in *Pichia pastoris* X33. Moreover, the intracellular activities of DSB and ManA by  $\alpha$ -factor are higher than Scw11, Dse4 and Exg1, and the

\*通讯作者, 电子邮箱: serena20112014@mail.scuec.edu.cn

intracellular activity of ManA was higher than DSB (the molecular weight of ManA was larger than DSB). Thus, when ManA were expressed in *Pichia pastoris*, different signal peptide, such as Dse4, could be used for improving the secretion efficiency. This study provides a basis for identifying more available signal peptides and screening for the optimal signal peptide for the target protein.

**Key Words** Signal peptide *Pichia pastoris* xylanase (DSB) mannanase (ManA)

木聚糖酶和甘露聚糖酶是两种重要的半纤维素酶,在半纤维素的降解中起着非常重要的作用。目前越来越多的木聚糖酶和甘露聚糖被发掘且应用于食品、饲料、造纸等行业<sup>[1-4]</sup>。酶制剂的工业生产和应用中,需要性质优异的酶,因此高效分泌表达重组外源蛋白的基因工程菌受到越来越多的关注。巴斯德毕赤酵母表达系统是目前应用非常广泛的外源蛋白表达系统,已成功表达了多种外源蛋白,且其中一些外源蛋白的表达可达到每升克级的水平(g/l)<sup>[5]</sup>,但也仍有很多外源蛋白的表达量相对较低,因此提高毕赤酵母表达外源蛋白的水平是减少工业生产成本的一个重要手段。

信号肽是实现外源蛋白分泌表达的重要元件,信号肽的功能主要是调节蛋白前体的折叠,引导蛋白质的穿膜转运,对蛋白质的分泌起着至关重要的作用<sup>[6-7]</sup>。已有的研究结果显示不同的信号肽对同一蛋白的引导效率是不一样的。石艺平等通过二维电泳的数据分析,结合毕赤酵母的基因组测序结果筛选出7种毕赤酵母中高分泌水平的蛋白,将这7种蛋白的信号肽和来自酿酒酵母的 $\alpha$ -factor用于漆酶的表达,结果显示不同信号肽介导表达的漆酶酶活差别较大<sup>[8]</sup>。因此,在外源蛋白表达的研究中,寻找合适的信号肽对提高外源蛋白的表达量具有重要意义。

目前毕赤酵母表达系统中应用最广泛的信号肽是来自酿酒酵母的 $\alpha$ -factor<sup>[9-10]</sup>。但 $\alpha$ -factor对引导小分子多肽和蛋白的分泌非常有效,而对大分子蛋白的分泌优势并不明显<sup>[11]</sup>。其它来源的信号肽也在毕赤酵母中逐渐得到应用,包括PHO1、SUC2、一些蛋白自身的信号肽等<sup>[12-13]</sup>。也有一些毕赤酵母内源信号肽被逐渐挖掘出来,Liang等预测并验证获得了3个毕赤酵母内源信号肽,Scw11、Dse4和Exg1,将其用于EGFP和CALB的表达,结果发现3个信号肽均能有效的介导两种外源蛋白的表达,且Dse4和Exg1的分泌效率甚至比 $\alpha$ -factor更优秀一些<sup>[14]</sup>。

本实验室前期研究中获得了两种耐热半纤维素酶-木聚糖酶DSB<sup>[15]</sup>和甘露聚糖酶ManA<sup>[16]</sup>,具有很好的工业应用前景。为提高DSB和ManA在毕赤酵母中的胞外酶活,本研究选择了上述3种毕赤酵母内源信号肽,Scw11、Dse4和Exg1,分别分泌表达DSB和ManA,并与 $\alpha$ -factor进行比较,从而选择适合DSB和ManA高效表达的信号肽。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

含木聚糖酶DSB基因的质粒pPIC9K/DSB和含甘露聚糖酶ManA基因的质粒pPIC9K/ManA由研究室构建并保藏。表达载体pPICZ $\alpha$ A、巴斯德毕赤酵母X33、大肠杆菌Top10均由实验室保藏。

#### 1.1.2 工具酶及试剂

限制性内切酶、PrimeSTAR Max DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等工具酶及 DNA marker、蛋白质 marker 购自 TaKaRa 公司；TaKaRa Bradford Protein Assay Kit 购自碧云天公司；质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 清洁试剂盒等购自上海 AxyPrep 公司；底物燕麦木聚糖 和角豆胶购于 Sigma 公司；蛋白胨和酵母提取物购自于 Oxoid 公司；无氨基酵母氮源 YNB、山梨醇和琼脂购自 Biosharp 公司；博来霉素 Zeocin 购自 invitrogen 公司；其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.1.3 培养基

大肠杆菌培养基 LB、毕赤酵母培养基 YPD、毕赤酵母抗性选择平板 YPDSZ（含抗生素 Zeocin，终浓度 100  $\mu\text{g/ml}$ ），毕赤酵母生长 / 诱导培养基 BMGY / BMMY 等培养基配方见 invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

## 1.2 方法

### 1.2.1 不同信号肽基因的克隆及表达载体的构建

本研究中采用的信号肽 Scw11、Dse4 和 Exg1 的基因序列见表 1，设计的引物见表 2，并在 5'端和 3'端分别引入限制性内切酶 *Bsp*T104 I 和 *Eco*R I 位点（下划线标记）。以毕赤酵母 X33 基因组为模板，PCR 扩增获得各信号肽的基因片段，与质粒 pPICZ $\alpha$ A 同时进行双酶切，然后分别进行连接从而将不同信号肽的基因片段定向插入 pPICZ $\alpha$ A 质粒中（图 1），构建含有不同信号肽的毕赤酵母表达载体，并送至武汉擎科生物有限公司进行测序验证。

表 1 3 种内源信号肽基因序列

Table 1 Three endogenous signal peptide gene sequences

信号肽	基因序列 (5'→3')
Scw11	ATGCTATCAACTATCTTAAATATCTTTATCCTGTTGCTCTTCATACAGGCATCCCTACAG
Dse4	ATGTCATTCTCTTCCAACGTGCCACAACCTTTCTTGTGTTGTTCTGTTGACCAATATAGTCAGTGGA
Exg1	ATGAACCTGTACCTAATTACATTACTATTCGCCAGTCTATGCAGCGCA

表 2 PCR 扩增引物序列

Table 2 Sequence of PCR amplification primers

信号肽	引物	引物序列 (5'→3')	酶切位点
Scw11	SCW11F	CCTTCGAAACGATGCTATCAACTATC	<i>Bsp</i> T104 I
	SCW11R	GTGAATTCCTGTAGGGATGCCTG	<i>Eco</i> R I
Dse4	DSE4F	GCTTCGAAACGATGTCATTCTCTCC	<i>Bsp</i> T104 I
	DSE4R	GCTGAATTCCTCCACTGACTATATTGGTC	<i>Eco</i> R I
Exg1	EXG1F	GGCTTCGAAACGATGAACCTGTACC	<i>Bsp</i> T104 I
	EXG1R	GTGAATTCCTGCGCTGCTGCATAGACTG	<i>Eco</i> R I

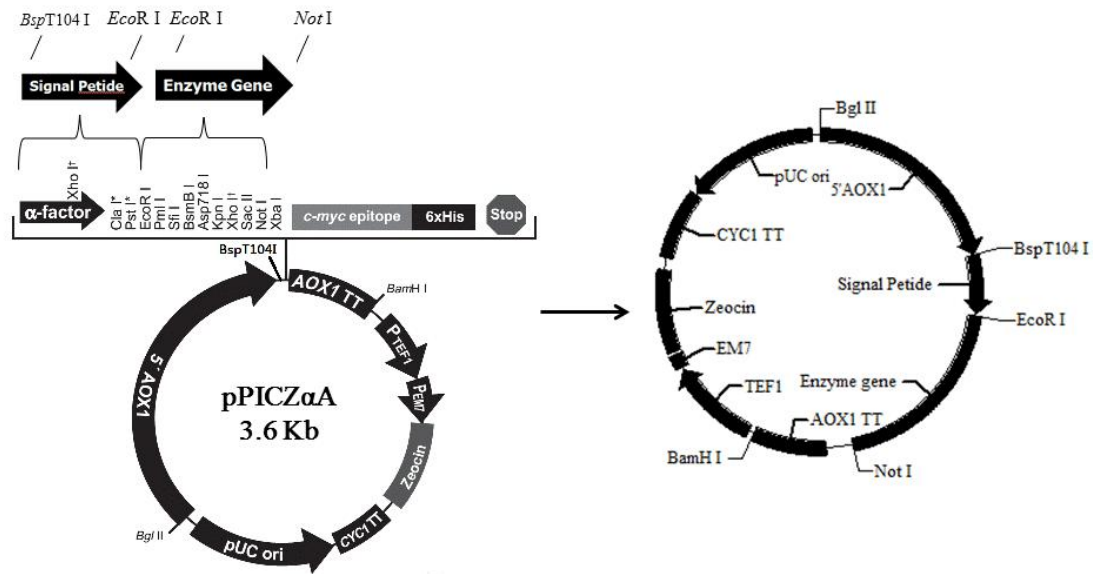


图 1 基于不同信号肽的重组质粒构建示意图

Fig.1 Construction of recombinant plasmids based on different signal peptides

### 1.2.2 不同信号肽介导的 DSB 和 ManA 表达载体的构建

实验室前期构建的含 DSB 和 ManA 基因的质粒 pPIC9K/DSB 和 pPIC9K/ManA 中, DSB 和 ManA 基因片段两端的酶切位点为 *EcoR* I 和 *Not* I, 与 1.2.2 中构建的三种信号肽表达载体及 pPICZαA 同时进行双酶切, 连接后转化大肠杆菌 Top 10, 使用 *AOX1* 通用引物进行菌落 PCR 验证获得阳性转化子<sup>[17]</sup>, 并送至武汉擎科生物有限公司进行测序验证。

### 1.2.3 重组酵母的构建、筛选及诱导表达

采用 *Sac*I 分别线性化上述构建的基于不同信号肽的 DSB 和 ManA 表达载体, 之后采用电转化法转化宿主菌毕赤酵母 X33, 涂布于 YPDSZ 抗性筛选平板上, 30℃ 倒置培养约 3 天。使用 *AOX1* 通用引物对平板上长出的转化子进行菌落 PCR 验证获得阳性转化子。将各阳性转化子接种于含有 25 ml BMGY 培养基的 250 ml 三角瓶中, 30℃、250 rpm 培养至 OD<sub>600</sub> 达到 2.0-6.0, 取适量体积的菌悬液 8000 rpm 离心去上清, 将菌体重悬于含有 25 ml BMMY 培养基的 250 ml 三角瓶中, 使每瓶 BMMY 培养基中重组菌的起始 OD<sub>600</sub> 为 1.0。每隔 24 h 取样, 并补加 1% 甲醇, 连续培养至 144 h。以毕赤酵母 X33 作为阴性对照。所有实验数据均重复 3 次。

### 1.2.4 重组酵母拷贝数鉴定

目的基因拷贝数显著地影响目的蛋白的表达量, 在考察信号肽分泌能力的时候, 有必要排除拷贝数对表达量的影响。用酵母基因组提取试剂盒提取各重组菌的基因组, 然后采用 real-time quantitative PCR 以双标准曲线的方法测定目的基因的拷贝数<sup>[18]</sup>。

### 1.2.5 重组菌上清及胞内酶活力的测定

取样后离心收集上清, 采用 DNS 法<sup>[19]</sup>测定各重组菌发酵上清液的木聚糖酶和甘露聚糖酶的酶活。此外还测定了各重组菌胞内的酶活, 取适量的发酵液离心并去除上清, 用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液重悬洗涤菌体两次, 然后再用等量的缓冲液重悬, 加入适量酸洗玻璃珠振荡破碎 30 min<sup>[20]</sup>, 离心后收集上清, 采



用 DNS 法<sup>[18]</sup>检测木聚糖酶和甘露聚糖酶的酶活。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳分析及发酵上清液蛋白浓度的测定

摇瓶发酵结束后，取等体积各重组菌的上清液及胞内溶液进行 SDS-PAGE 电泳分析，具体操作方法参考《分子克隆实验指南》第二版。采用 Bradford 法<sup>[21]</sup>测定蛋白质含量，以牛血清白蛋白 BSA 作为标准蛋白质，考马斯亮蓝 G250 为染色液，于 595 nm 检测吸光度。

2 结果与分析

2.1 不同信号肽介导的 DSB、ManA 表达载体和重组菌的构建及拷贝数鉴定

以提取的毕赤酵母 X33 基因组为模板，通过 PCR 扩增获得 3 个信号肽 Scw11、Dse4 和 Exg1 的基因片段，大小分别为 79bp、89bp 和 68bp，与预期大小一致（图 2）。将上述 3 种信号肽的基因片段与 pPICZαA 同时使用 *Bsp*T104 I 和 *Eco*R I 双酶切，然后分别连接获得含不同信号肽的质粒，命名为 pPICZA-SCW11、pPICZA-DSE4 和 pPICZA-EXG1，测序结果与 3 个信号肽的基因序列一致，表明以上 3 个质粒构建成功。随后将以上 3 个质粒、pPICZαA、pPIC9K/DSB 和 pPIC9K/ManA 同时用 *Eco*R I 和 *Not* I 进行双酶切，然后将 DSB 和 ManA 的基因片段（大小分别为 585bp 和 852bp）（图 3）分别连接到 4 个含不同信号肽的质粒上获得不同信号肽介导的 DSB 和 ManA 表达载体，命名为 pPICZA/SCW11-DSB(ManA)、pPICZA/DSE4-DSB(ManA)、pPICZA/EXG1-DSB(ManA)和 pPICZαA/ DSB(ManA)，测序结果验证以上 8 个重组质粒构建成功。使用电转化的方法获得不同信号肽介导的 DSB 和 ManA 重组菌，分别命名为 X33/SCW11-DSB(ManA)、X33/DSE4-DSB(ManA)和 X33/EXG1-DSB(ManA)，以 X33/α-DSB(ManA)为对照。为了比较各信号肽引导外源蛋白分泌的能力，需排除报告基因的拷贝数的影响，采用实时荧光定量 PCR 的方法对各重组菌中报告基因的拷贝数进行了测定，结果如表 3 所示，各重组菌均只含一个拷贝的报告基因，消除了基因剂量对外源蛋白表达的影响。

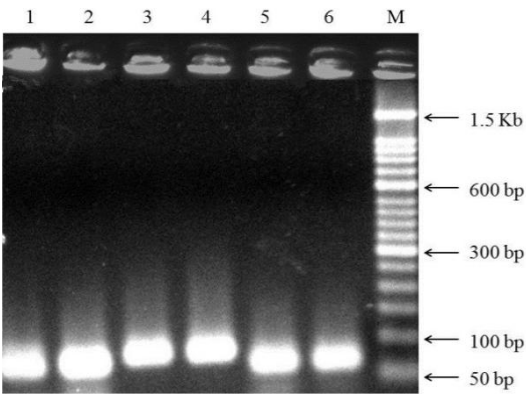


图 2 3 个信号肽基因 PCR 产物凝胶电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis of three signal peptide PCR production  
Lane 1-2: Scw11; Lane 3-4: Dse4;  
Lane 5-6: Exg1;  
M: 50 bp DNA Ladder Marker

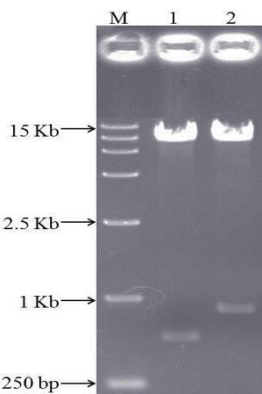


图 3 DSB 和 ManA 基因片段的凝胶电泳图

Fig.3 Gel electrophoresis of DSB and ManA gene fragments  
Lane 1: DSB; Lane 2: ManA;  
M: DL 15000 DNA Marker

重组菌报告基因拷贝数的鉴定	
er of reporter gene in <i>P. pa</i>	
重组菌	拷
33/α-DSB	0

X33/SCW11-DSB	0.86
X33/DSE4-DSB	0.91
X33/EXG1-DSB	0.82
X33/ $\alpha$ -ManA	0.94
X33/SCW11-ManA	0.87
X33/DSE4-ManA	1.06
X33/EXG1-ManA	0.91

2.2 不同信号肽对木聚糖酶 DSB 分泌表达水平的影响

对 X33/SCW11-DSB、X33/DSE4-DSB、X33/EXG1-DSB 和 X33/ $\alpha$ -DSB 在 BMMY 培养基中进行摇瓶发酵，每隔 24 h 取样，测定发酵液菌体浓度及发酵上清液的酶活，每组实验均重复 3 次，取平均值作为最终结果。从图 4 可以看出，不同信号肽对介导的 DSB 分泌表达的重组酵母生长状况无明显的影响，各重组菌生长良好。然而，在 Scw11、Dse4、Exg1 和  $\alpha$ -factor 4 种信号肽的引导下，DSB 的上清液酶活水平差别较大，如图 5 所示，X33/ $\alpha$ -DSB 发酵上清液的酶活最高，发酵至 120 h 时可达 1162 U/ml，约为 X33/DSE4-DSB 的 1.9 倍。但 X33/DSE4-DSB 的发酵上清液的酶活又明显高于 X33/SCW11-DSB 和 X33/EXG1-DSB。当各重组菌发酵至 144 h 时，取相同体积的发酵上清液进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 8 所示，DSB 大小为 23KDa。同时对发酵上清液的蛋白浓度进行测定，得到各重组菌上清液中比酶活（如表 4）的多少与酶活测定的结果一致。以上结果表明，木聚糖酶 DSB 在毕赤酵母 X33 中分泌表达时， $\alpha$ -factor 介导的分泌表达效率明显优于 Scw11、Dse4 和 Exg1。

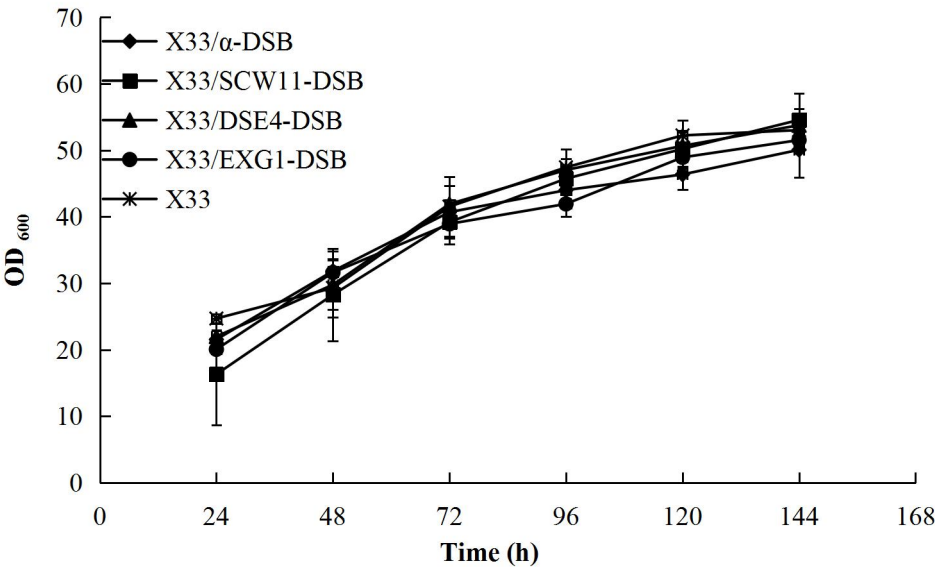


图 4 不同信号肽介导的 DSB 重组酵母的生长曲线

Fig.4 Growth curve of recombinants for expression of DSB with different signal peptide

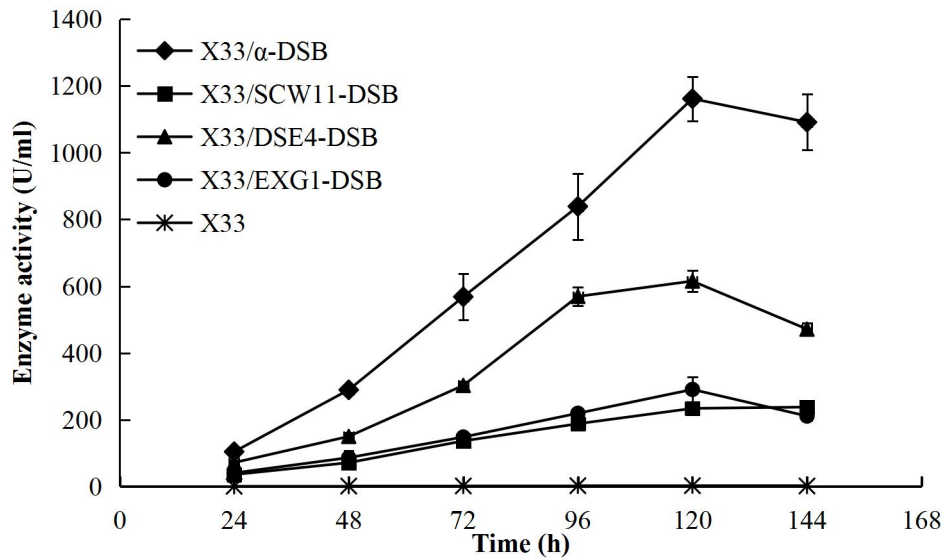


图 5 不同信号肽介导的 DSB 重组酵母发酵上清液的酶活曲线

Fig.5 The DSB activity curve of recombinants with different signal peptide

### 2.3 不同信号肽对甘露聚糖酶 ManA 分泌表达水平的影响

对 X33/SCW11-ManA、X33/DSE4-ManA、X33/EXG1-ManA 和 X33/α-ManA 在 BMMY 培养基中进行摇瓶发酵，发酵液菌体浓度及发酵上清液的酶活测定结果如图 6 和图 7 所示。从图 6 可以看出，Scw11、Dse4 和 α-factor 介导的 ManA 分泌表达重组酵母生长状况无明显差别，而 Exg1 介导的 ManA 分泌表达重组菌生长略差。对于 ManA 的上清液酶活水平来说，由图 7 可知，使用不同信号肽时 ManA 的上清液酶活水平差别也较大，其中发酵前期 X33/DSE4-ManA 发酵上清液酶活力比 X33/α-ManA 高，在发酵至 144 h 时发酵上清液酶活力相当（都接近 400 U/ml），但却明显高于 X33/SCW11-ManA 和 X33/EXG1-ManA。对各重组菌的发酵上清液也进行了 SDS-PAGE 分析（图 8），结果表明 ManA 大小为 30 KDa。同时对发酵上清液的蛋白浓度进行测定，得到各重组菌上清液中比酶活的多少（如表 4）与酶活测定的结果一致。上述结果显示，甘露聚糖酶 ManA 在毕赤酵母 X33 中分泌表达时，Dse4 和 α-factor 介导的分泌表达效率明显优于 Scw11 和 Exg1。

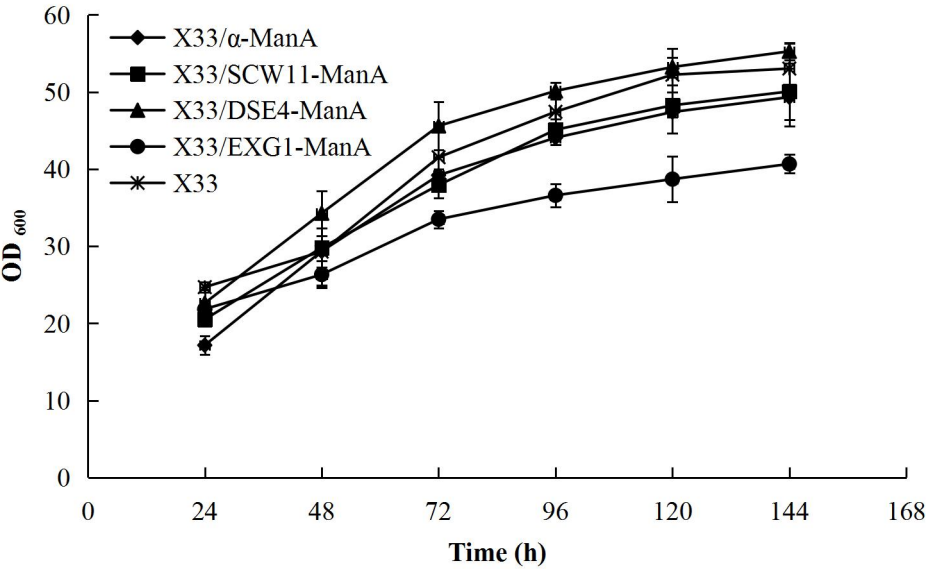


图 6 不同信号肽介导的 ManA 重组酵母的生长曲线

Fig.6 Growth curve of recombinants for expression of ManA with different signal peptide

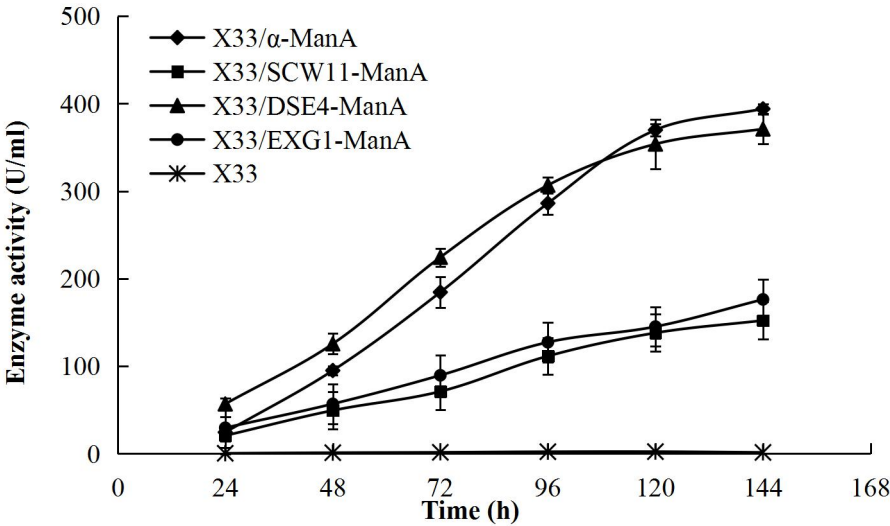


图 7 不同信号肽介导的 ManA 重组酵母发酵上清液的酶活曲线

Fig.7 The ManA activity curve of recombinants with different signal peptide

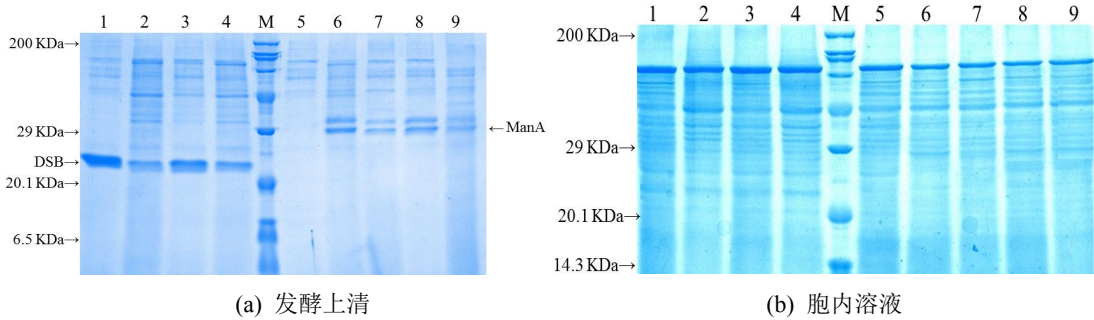


图 8 各重组菌发酵上清液和胞内溶液的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.8 SDS-PAGE analysis of supernatant (a) and intracellular sample



(b)

Lane 1:  $\alpha$ -DSB; Lane 2: Scw11-DSB; Lane 3: Dse4-DSB; Lane 4: Exg1-DSB; M: Premixed Protein Marker (Broad); Lane 5: X33; Lane 6:  $\alpha$ -ManA; Lane 7: Scw11-ManA; Lane 8: Dse4-ManA; Lane 9 : Exg1-ManA

表 4 不同信号肽介导的重组酵母胞外比酶活的测定结果(144 h)

Table.4 DSB and ManA supernatant specific activity of recombinants with different signal peptide(144 h)

重组菌	胞外蛋白浓度 (mg/l)	胞外酶活(U/ml)	胞外比酶活(U/mg)
X33/ $\alpha$ -DSB	1487	1092	734
X33/SCW11-DSB	1324	238	180
X33/DSE4-DSB	1313	471	359
X33/EXG1-DSB	1154	211	183
X33/ $\alpha$ -ManA	474	394	835
X33/SCW11-ManA	383	152	397
X33/DSE4-ManA	442	371	839
X33/EXG1-ManA	309	176	570

2.4 各重组菌 DSB 或 ManA 胞内滞留情况及胞外比酶活的分析

为了分析不同信号肽介导 DSB 或 ManA 分泌表达时胞内滞留的情况，发酵结束后取等量的细胞进行破碎，对胞内溶液的酶活进行了测定且进行了 SDS-PAGE 电泳，结果如图 8 和图 9 所示。从图中可以看出，无论使用哪一种信号肽，DSB 或 ManA 在重组菌胞内都有一定的滞留，但是分子量大一些的 ManA 的滞留酶活明显大于分子量小一些的 DSB。且 $\alpha$ -factor 介导的 DSB 和 ManA 重组菌胞内酶活明显高于 Scw11、Dse4 和 Exg1 这 3 种内源信号肽，分别达到 40.2 U/ml 和 67.2 U/ml。有研究指出 $\alpha$ -factor 对引导小分子多肽和蛋白的分泌非常有效，而对大分子蛋白的分泌优势并不明显<sup>[1]</sup>。因此在表达分子量较大的外源蛋白 ManA 时，可选用其它的信号肽，如 Dse4，会减少外源蛋白在胞内的滞留从而在一定程度上提高外源蛋白的分泌量。

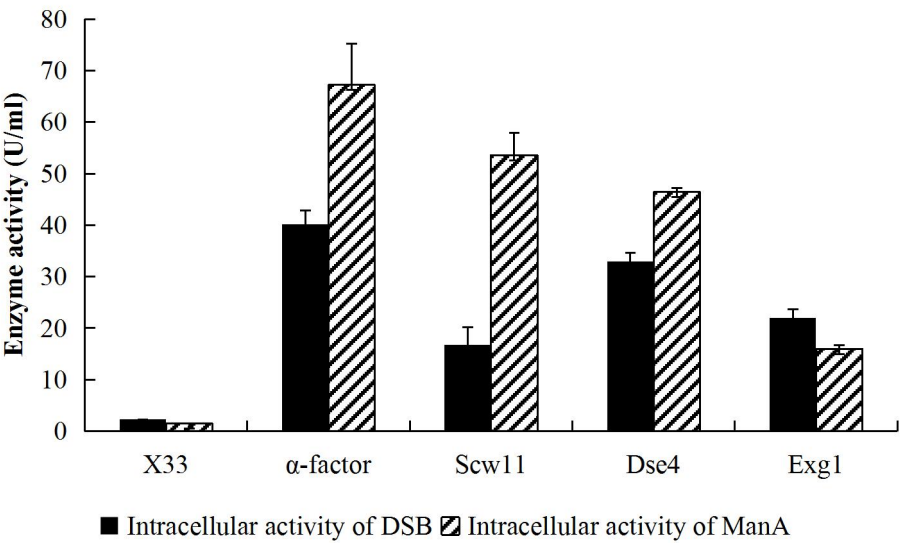


图 9 不同信号肽介导的重组酵母胞内酶活力的测定结果

Fig.9 DSB and ManA intracellular activity of recombinants with different signal peptide

chinaXiv:201707.00661v1

### 3 讨论

木聚糖酶和甘露聚糖是两种应用广泛的半纤维素酶,本实验室前期研究获得的耐热木聚糖酶 DSB<sup>[15]</sup>和耐热甘露聚糖酶 ManA<sup>[16]</sup>(最适反应温度均为 75℃)具有较好的工业应用前景。不同的信号肽对同一外源蛋白的引导效率是不一样的,选择并使用高效的信号肽是提高毕赤酵母外源蛋白表达和节约生产成本的有效途径之一。

Liang 等<sup>[14]</sup>的研究将内源的信号肽 Scw11、Dse4 和 Exg1 分别用于 EGFP(分子质量为 27 KDa)和 CALB(分子质量为 36 KDa)分泌表达,结果发现 3 个信号肽均能有效的介导两种外源蛋白的表达,且 Dse4 和 Exg1 的分泌效率甚至比  $\alpha$ -factor 更优秀一些。石艺平等<sup>[8]</sup>研究发现漆酶在毕赤酵母 Exg1 蛋白信号肽引导下菌株酶活力与漆酶自身信号肽引导下的活力差异不大。本研究选择了 3 种毕赤酵母内源信号肽 Scw11、Dse4 和 Exg1,分别在毕赤酵母 X33 中分泌表达 DSB 和 ManA,并与  $\alpha$ -factor 进行比较。摇瓶发酵的结果显示:对 DSB(分子量为 23 KDa),使用  $\alpha$ -factor 时上清液酶活力与比酶活明显高于 Scw11、Dse4 和 Exg1,胞外酶活达到 1162 U/ml;而对于 ManA(分子量为 30 KDa),发酵前期 X33/DSE4- ManA 发酵上清液酶活力比 X33/ $\alpha$ - ManA 高,且后期使用 Dse4 和  $\alpha$ -factor 时酶活力(接近 400 U/ml)相当,但明显高于 Scw11 和 Exg1。在外源蛋白表达时,寻找合适的信号肽是提高外源蛋白表达量的重要手段之一,因此由上述结果可知,在 X33 中表达 DSB 时应选用  $\alpha$ -factor,而表达 ManA 时应选用 Dse4 或  $\alpha$ -factor。胞内酶活的测定结果表明使用  $\alpha$ -factor 时,胞内 DSB 和 ManA 的滞留酶活显著高于其它 3 种内源信号肽,且分子量大小为 30 KDa 的 ManA 的滞留酶活又明显高于分子量大小为 23 KDa 的 DSB,因此在表达 ManA 蛋白时选用其它的信号肽(如 Dse4),会在一定程度上减少外源蛋白在胞内的滞留。

为了进一步提高两种半纤维素酶的分泌表达效率,未来的工作可对 Dse4 进行改造,以使其在毕赤酵母表达系统中更好地发挥功能,进而为高效表达外源蛋白奠定基础。

**致谢** 本论文获得中央高校基本科研业务费专项资金项目(CZW15026, CZW15012)支持。

### 参考文献

- [1] 陈威威,江正强,王瑞君.绵毛嗜热丝孢菌木聚糖酶对面包品质的改善.食品与发酵工业,2008,34(12):1-4.  
Chen W W,Jiang Z Q,Wang R J. Effect of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* on Bread Quality. Food and Fermentation Industries, 2008,34(12):1-4.
- [2] 张金伟.甘露聚糖酶对动物生产性能的影响.饲料工业,2016,37(12):62-64.  
Zhang J W.Effects of the  $\beta$ -mannanase on the production performance of animals. Feed Industry, 2016,37(12):62-64.
- [3] 郝涤非.木聚糖酶及其复合酶在面包生产中的应用与探索.中国酿

- 造, 2008,27(16):77-80.
- Hao D F. Application and exploration of xylanase and related compound enzyme in bread production. *China Brewing*, 2008, 27(16):77-80.
- [4] 杨少杰,高海有,李晞,等. 甘露聚糖酶和木聚糖酶在纸浆漂白中的应用. *造纸科学与技术*, 2016,35 (4) :71-76.
- Yang S J, Gao H Y, Li X ,et al.. Application of Mannanase and Xylanase in the Pulp Bleaching. *Paper Science & Technology*, 2016,35 (4) :71-76.
- [5] 王冶,郑甲,唐诗哲,等. 外源蛋白在巴斯德毕赤酵母中高效分泌表达的前沿技术. *基因组学与应用生物学*,2014,33(3):689-694.
- Wang Y, Zheng J, Tang S Z, et al.. Advance Technologies of The Efficient Secretary Expression of Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*. *Genomics and Applied Biology*, 2014,33(3):689-694.
- [6] L Su, C Xu, RW Woodard, et al. A novel strategy for enhancing extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2013,97(15): 6705-6713.
- [7] S Li, S Sing, Z Wang. Improved expression of *Rhizopus oryzae*  $\alpha$ -amylase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression & Purification*, 2011, 79(1): 142-148.
- [8] 石艺平,周雪,胡美荣,等. 不同信号肽对毕赤酵母表达漆酶的影响. *微生物学报*,2014,54(12):1446-1452.
- Shi Y P, Zhou X, Hu M R, et al.. Effect of signal peptides on the expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014,54(12):1446-1452.
- [9] Shen M, Wang Q, Mu X, et al. Expression, purification and characterization of recombinant human beta-amyloid 1-42 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2009,63(2):84-88.
- [10] S. Richter, J. Nieveler, H. Schulze, et al. High yield production of a mutant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and its purification. *Biotechnol Bioeng*, 2006,93(5):1017-1022.
- [11] Daly R, Hearn M T W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 2005,18(2):119-138.
- [12] Wege S, Khan GA, Jung JY, et al. The EXS Domain of PHO1 Participates in the Response of Shoots to Phosphate Deficiency via a Root-to-Shoot Signal. *Plant Physiology*, 2016, 170(1):385-400.
- [13] Q Sun, JS Wang, R Li, et al. Establishment of suc2 signal sequence trap system. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(4):379-384.
- [14] Liang S L, Li C, Ye Y R, et al. Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(1): 97-105.
- [15] 李思佳,王亚伟,付正,等. 嗜热真菌木聚糖酶 1YNA 及其双硫键突变体在毕赤酵母中的表达. *中国生物工程杂志*, 2013,33 (3):

74-79.

Li S J, Wang Y W, Fu Z, et al. Expression of *Thermomyces lanuginosus* xylanase 1YNA and its disulphide bridge mutant in *Pichia Pastoris*. *China Biotechnology*, 2013, 33(3):74-79.

- [16] 张巍, 王亚伟, 陈丰, 等. 一株全基因合成耐热甘露聚糖酶的表达及酶学性质分析. *中国生物工程杂志*, 2014, 34 (8): 41-46.

Zhang W, Wang Y W, Chen F, et al. Gene Synthesis, Expression and Characterization of a Thermostable Endo- $\beta$ -1,4-mannanase. *China Biotechnology*, 2014, 34(8):41-46.

- [17] Wang Y W, Shi P J, Luo H Y, et al. Cloning, over-expression and characterization of an alkali-tolerant endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Penicillium freii* F63. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(6):710-714.

- [18] A Bharuthram, M Paximadis, ACP Picton, et al. Comparison of a quantitative Real-Time PCR assay and droplet digital PCR for copy number analysis of the CCL4L genes. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 25(7):28-35.

- [19] 余红英, 孙远明, 王炜军, 等. 枯草芽孢杆菌 SA-22  $\beta$ -甘露聚糖酶的纯化及其特性. *生物工程学报*, 2003, 19 (3): 327-331.

Yu H Y, Sun Y M, Wang W, et al. Purification and Properties of *Bacillus subtilis* SA-22 Endo-1,4- $\beta$ -D-mannanase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, 19 (3): 327-331.

- [20] 易弋, 容元平, 程谦伟, 等. 不同破壁方法提取酵母菌总 RNA 的比较. *食品科学*, 2011, 32(11):161-164.

Yi G, Rong Y P, Cheng Q W, et al. Comparison of different cell wall disruption methods for Yeast total RNA extraction. *Food Science*, 2011, 32(11):161-164.

- [21] Orna E, Tsaffir Z. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2010, 38(38):1918-1918.